



TITLE:

# 試験管内培養系検証システムの確立による抗体可変部遺伝子体細胞突然変異機構の解明

AUTHOR(S):

清水, 章

---

CITATION:

清水, 章. 試験管内培養系検証システムの確立による抗体可変部遺伝子体細胞突然変異機構の解明. 2004

ISSUE DATE:

2004-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/84754>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

試験管内培養系検証システムの確立による  
抗体可変部遺伝子体細胞突然変異機構の解明

課題番号 14570105

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

京 都 大 学 図 書



1040946300

附 属 図 書 館

平成16年5月

研究代表者 清 水 章  
(京都大学医学研究科教授)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金 基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書

試験管内培養系検証システムの確立による  
抗体可変部遺伝子体細胞突然変異機構の解明

課題番号 14570105

## は し が き

### 研究組織

研究代表者 : 清 水 章 (京都大学医学研究科教授)

### 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成14年度	2, 3 0 0	0	2, 3 0 0
平成15年度	1, 2 0 0	0	1, 2 0 0
総 計	3, 5 0 0	0	3, 5 0 0

### 研究発表

#### (1) 学会誌等

1. Selective accumulation of type-1 effector cells expressing P-selectin ligand and/or  $\alpha 4 \beta 7$ -integrin at the lesions of autoimmune gastritis.  
Katakai, T., Mori, K. J., Masuda, T. and Shimizu, A. *Internat. Immunol.* **14**, 167-175 (2002).
2. Effect of environmental antigens on the Ig diversification and the selection of productive V-J joints in the bursa.  
Arakawa, H., Kuma, K., Yasuda, M., Ekino, S., Shimizu, A. and Yamagishi, H. *J. Immunol.* **169**, 818-828 (2002).
3. TH2 dominance and defective development of CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset in Id2-deficient mice.  
Kusunoki, T., Sugai, M., Katakai, T., Omatsu, Y., Iyoda, T., Inaba, K., Nakahata, T., Shimizu, A. and Yokota, Y. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 136-142 (2003).
4. Chemokine-Independent Preference of T-helper-1 Cells in Trans-endothelial Migration.  
Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H., Nambu, Y., Matsuda, E., Agata, Y. and Shimizu, A. *J. Biol. Chem.* **277**, 50948-50958, (2002).
5. Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching.

- Sugai, M., Gonda, H., Kusunoki, T., Katakai, T., Yokota, Y. and Shimizu, A. *Nature Immunol.* **4**, 25-30 (2003).
6. Th1-biased tertiary lymphoid tissue supported by CXCL13-producing stromal network in the chronic lesions of autoimmune gastritis.  
Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Hiroyuki Gonda, H. and Shimizu, A. *J. Immunol.* **171**, 4359-4368 (2003).
7. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression.  
Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K. J., Yokota Y. and Shimizu, A. *J Exp. Med.* **198**, 1427-1437 (2003).
8. Tanscription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin.

008	Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y. and Shimizu, A. <i>Science</i> <b>302</b> , 2137-2140 (2003).	
009	(2) 口頭発表	
	省略	
007	(3) 出版物	
	該当なし	

#### 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

## 研究の目的および研究成果の概要

抗体の親和性成熟は免疫反応の後期において、同一の抗原に対する抗体の親和性が上昇し、極めて低い濃度の抗原をも除去・不活化できるようになる現象である。親和性が上昇した抗体を産生する B リンパ球の一部は記憶 B 細胞として生体内に比較的長く留まり、二次免疫応答では当初より親和性の高い抗体が産生される。したがって抗体の親和性成熟現象は、原義的意味での免疫現象が効率良く成立するために欠かせない重要な生理現象である。

親和性成熟過程は、遺伝子組換えによって完成された抗体の可変部遺伝子の中に極めて特異的に起こる過剰突然変異（体細胞突然変異）によって、抗体の可変部遺伝子の配列が変化することが基盤となっている。この体細胞突然変異によって変化した可変部配列の中に、元の抗原に対しより高い親和性を有する抗体をコードするものが生じ、このような高親和性の抗体を産生する B 細胞が、胚中心において低濃度の抗原による選択を受けて増殖するため、結果として高親和性の抗体が効率良く産生される。すなわち、体細胞突然変異の分子機構を解明することは免疫現象を理解する上で欠かせない重要な課題であることは疑う余地がない。さらに、特定遺伝子の限られた部位に通常の千倍にもおよぶ頻度で突然変異が誘導される現象は他に例がなく、遺伝子の複製・修復の見地からも特に興味深い、医化学・分子生物学的課題でもあるので、世界的にも多くの研究者がその解明向かって競いあっており、転写機構の関与、遺伝子領域の特異性などの解析が推進されてきた。

ところが、体細胞突然変異の具体的な分子機構、ことにこの現象に関与する分子は全くといえる程知られていない。唯一の例外は activation-induced cytosine deaminase (AID) の関与であり、この遺伝子を欠くと、ともに胚中心で B リンパ球に特異的に起こるとされるクラススイッチと体細胞突然変異が起こらなくなる。しかしながら、この AID 遺伝子が如何にしてこの二つの現象、一つは遺伝子の組換え、もう一つは突然変異を引き起すのかについての具体的機構は依然不明である。

本研究ではクラススイッチと体細胞突然変異が共に極めて近い分化段階の B 細胞におこり、しかも同じ AID 遺伝子の産物を必要としていることに注目した。クラススイッチ組換えは試験管内で適切な刺激を B リンパ球に与えることで極めて効率良く誘導できる。このときもちろん AID 遺伝子の発現は誘導されるのであるが、この刺激では B リンパ球は体細胞突然変異を起こさず、

ごく少数の体細胞突然変異にのみ関与する分子の発現を欠いていると考えられる。本研究では、遺伝子導入やノックアウトマウスに由来する B、T 細胞あるいは細胞株をうまく組み合わせることにより、まず細胞培養系で効率良く体細胞突然変異を検出・計測し得る実験系を構築し、これを用いて体細胞突然変異の分子機構を解明することを目指した。

本研究では、I d 2 遺伝子の破壊マウスにおいて、血清中の I g E 量が著増することを見いだした。本研究によってこの現象の主な分子基盤として、B リンパ球における  $\epsilon$  鎖へのクラススイッチ組換えが著明に亢進していること、この組換えが転写因子 E 2 A によって活性化される  $\epsilon$  鎖非組換え型転写に依存していること、正常 B リンパ球では T G F -  $\beta$  1 の信号を受けて I d 2 の発現が誘導され、これが E 2 A の作用を阻害することによって  $\epsilon$  鎖非組換え型転写を抑制する結果、 $\epsilon$  鎖へのクラススイッチ組換えが特異的にきわめて低く抑えられていることなどが明らかにされた。

さらに、同じ I d 2 遺伝子の破壊マウスにおいて、B リンパ球におけるクラススイッチ組換えと体細胞突然変異に必須の因子である、A I D の遺伝子転写活性も著増していることを見いだした。I d 2 遺伝子を過剰発現するとクラススイッチ組換えが抑制されることが知られていたが、本研究で、この抑制は I d 2 が A I D 遺伝子の転写を抑制する結果であることを証明し、この分子基盤として、A I D の遺伝子転写が転写因子 P a x 5 に依存していること、I d 2 が P a x 5 の活性に拮抗して働いていることなどによるものであることを、特異的発現に必要な十分な制御配列の同定とその詳細な解析によって明らかにした。以上のように、E 2 A、P a x 5 などのような転写活性化因子群と I d 2 をはじめとする転写抑制因子群の活性バランスがリンパ球の機能発現においてきわめて大きな意味を持っていると考えられた。これはリンパ球の活性化制御を理解する上で重要な知見である。

一方、I d 2 遺伝子の破壊マウスでは A I D の遺伝子発現量が著増しているにもかかわらず、体細胞突然変異率においては正常マウスと差が認められなかった。この事実は A I D がクラススイッチ組換えと体細胞突然変異に必須の因子であるが、これとは別の安全維持機構があり、これによって A I D の量だけで組換えや変異の量が制御されているのではないことを意味している。

本研究の成果は学会誌等に論文として発表した。本冊子にこれら論文の主なものを添付したので、研究成果の詳細についてはそちらを参照されたい。